

В. В. Писарев¹, Н. Е. Москалева¹, Ю. Б. Зверков¹, Л. Б. Смирнова¹, В. Г. Белолипецкая², Я. В. Суханов²

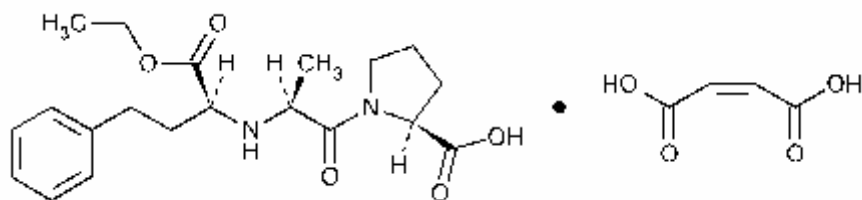
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНАЛАПРИЛА И ЭНАЛАПРИЛАТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

¹ ФГУП «Государственный научный центр по антибиотикам»

² Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины МЗ РФ

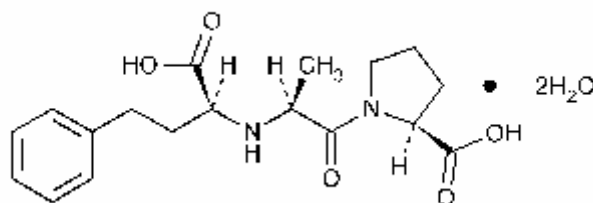
Разработан воспроизводимый и чувствительный метод количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Для повышения чувствительности и воспроизводимости определения исследуемые соединения обрабатывали диазометаном для получения метиловых эфиров, в качестве внутреннего стандарта использовали каптоприл ((S)-1-(3-Меркапто-2-метил-1-оксопропил)-L-пролин). Детектирование осуществляли в положительной области по ионам с m/z 377 (метиловый эфир эналаприлата) и 391 (метиловый эфир эналаприла), 267 (метиловый эфир каптоприла). Для выделения эналаприла, эналаприлата и каптоприла из плазмы крови и очистки экстракта использовали метод твердофазной экстракции. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта. Зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций 0,5 – 200 нг/мл. Предел обнаружения для эналаприлата и эналаприла в плазме составил одинаковое значение - 0,1 нг/мл.

Эналаприл, (S)-1-N-1-(этоксикарбонил)-3-фенилпропил-L-аланил-L-пролин в виде малеата (I) - гипотензивное, кардиопротективное средство, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента. Эмпирическая формула $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$. Молекулярная масса эналаприла 376.



I

Эналаприл является пролекарством из которого в организме образуется более активный метаболит эналаприлат - (S)-1-N-1-(карбокси)-3-фенилпропил-L-аланил-L-пролин (II). Эмпирическая формула $C_{18}H_{24}N_2O_5$. Молекулярная масса 348.



II

Средняя терапевтическая доза эналаприла 10-20 мг/сут, абсорбция из желудочно-кишечного тракта 60%. Максимальная концентрация эналаприла в крови достигается через 1 ч, эналаприлата - через 3-4 ч. [1].

В литературе имеется ряд публикаций, посвященных количественному определению в биологических образцах и хроматографическому поведению эналаприла и эналаприлата, а также сходных с ними по химической структуре соединений [2, 3, 4, 5]. Так, в работе [2]

определяли эналаприл и эналаприлат методом ВЭЖХ с УФ-детектором и чувствительностью обнаружения 1 мкг/мл. В работе [3] описаны условия определения лизиноприла в диапазоне концентраций 0,5 –75 нг/мл методом ЖХ/МС/МС, в котором эналаприлат использовался в качестве внутреннего стандарта. Авторами работы [4] приведены результаты количественного анализа эналаприла и эналаприлата в плазме крови иммуноферментным методом. Исследование влияния хроматографических факторов анализа (температура колонки, рН подвижной фазы) на симметрию пика эналаприла приведено в работе [5].

Целью настоящего исследования является разработка воспроизводимого и чувствительного метода количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

Материалы и методы

Анализ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1100» (США), оснащенным вакуумным дегазатором, градиентным насосом, автосамплером и термостатом колонок, а также масс-спектрометрическим детектором «Agilent 1100VL» (США) с ионизацией при атмосферном давлении в электроспрее (API-ES). При приготовлении пробы использовались вакуумный концентратор DNA mini (Австрия) и картриджи для твердофазной экстракции AccuBond II ODS-C₁₈, 100 мг производства «Agilent» (США).

В работе использовали следующие растворители: ацетонитрил 1-го сорта («Криохром», Санкт-Петербург), муравьиная кислота (Merck), ацетат аммония (Merck), диазометан получали, как описано в работе [6].

Для повышения чувствительности и воспроизводимости определения соединения обрабатывали диазометаном для получения метиловых эфиров, в качестве внутреннего стандарта использовали каптоприл ((S) – 1 – (3-Меркапто-2-метил-1-оксопропил)—L-пролин). Разделение осуществляли в градиентном режиме на колонке Zorbax SB-C₁₈, 5мкм, 4,6 x 150мм (США), при температуре 80°C. Подвижная фаза состояла из двух растворов: метанол – 0,1 М ацетат аммония – муравьиная кислота (95 : 5 : 0,5, об/об) (раствор А) и вода – 0,1 М ацетат аммония – муравьиная кислота (95 : 5 : 0,5, об/об) (раствор Б). Концентрация раствора А изменялась от 55% до 75% за 8 мин. Скорость потока 0,7 мл/мин. Объем вводимой пробы 50 мкл.

Параметры работы масс-спектрометрического детектора подбирали исходя из необходимости получения протонированных молекулярных ионов определяемых соединений. Детектирование осуществляли в положительной области по ионам с m/z 377 (метиловый эфир эналаприлата) и 391 (метиловый эфир эналаприла), 267 (метиловый эфир каптоприла). Фрагментор 50, напряжение капилляра 4000 В, температура азота 350°C, скорость 12 л/мин, давление небулайзера 35 psig (240 кПа).

Для выделения эналаприла, эналаприлата и каптоприла из плазмы крови и очистки экстракта методом твердофазной экстракции картридж предварительно промывали 1 мл ацетонитрила, 1 мл воды, 2 мл 3% водного раствора муравьиной кислоты. К 1 мл плазмы добавляли 1мл 6% водного раствора муравьиной кислоты и 100мкл раствора каптоприла с концентрацией 20 мкг/мл, перемешивали, центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин. Пробу переносили в картридж, промывали 0,5 мл 3% водного раствора муравьиной кислоты, затем элюировали определяемые соединения 1мл раствора ацетонитрил – 0,05 М ацетат аммония – муравьиная кислота (90 : 10 : 0,5, об/об). Полученный элюат упаривали досуха под вакуумом при температуре 60°C. Остаток растворяли в 50 мкл метанола, добавляли 200 мкл эфирного раствора диазометана, метилировали в течение 30 мин с последующим упариванием реакционной смеси при комнатной температуре на воздухе. Пробу растворяли в 100 мкл метанола и аликвоту 50 мкл переносили в хроматограф. Количественное определение эналаприла и эналаприлата проводили методом внутреннего

стандарта по площади пиков с использованием программного обеспечения ChemStation фирмы «Agilent» (США).

Разработанный метод был применен для изучения фармакокинетики и биоэквивалентности препарата ЭНАЛАПРИЛ таблетки, содержащего 10 мг эналаприла малеата, производства ЗАО «Северная Звезда» (Россия) в сравнении с препаратом РЕНИТЕК компании «Мерк Шарп и Доум» (Швейцария). В исследование были включены 18 добровольцев. Фармакокинетическое исследование проводили открытым перекрестным рандомизированным методом в 2 этапа с интервалом между приемами препаратов 14 дней. Образцы крови в количестве 4 мл отбирали из кубитальной вены через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 8; 12; 15 и 24 часа после приема препарата. Анализ фармакокинетических данных и оценка биоэквивалентности исследуемых препаратов проведены в соответствии с [7].

Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программы «ESTRIP» модельно-независимым методом. Были рассчитаны следующие параметры: максимальная концентрация C_{max} препаратов в крови (максимальное измеренное значение); время достижения максимальной концентрации T_{max} ; площадь под фармакокинетической кривой AUC_{0-t} ; площадь под фармакокинетической кривой $AUC_{0-\infty}$; период полувыведения $T_{1/2}$; среднее время удержания препаратов в системном кровотоке MRT; относительная скорость всасывания C_{max}/AUC_{0-t} . Для оценки исследуемого препарата рассчитывали f' - относительную биодоступность исследуемой лекарственной формы эналаприла по отношению к сравниваемой, определяемую отношением $AUC_{0-t,T}/AUC_{0-t,R}$ и f'' - относительную степень всасывания эналаприла, определяемая отношением $C_{max,T}/C_{max,R}$.

Полученные экспериментальные данные подвергались статистической обработке с помощью программы "Statistica" v 5.0 и EXCEL'97 для персонального компьютера. Рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение, среднее геометрическое значение, стандартное отклонение среднего результата, границы доверительного интервала, проведено парное сравнение фармакокинетических параметров. Оценка биоэквивалентности проводилась применительно к параметрам AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} (натуральные и ln-преобразованные данные).

Результаты и обсуждение

Хроматографические характеристики приведенной методики количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови приведены в табл. 1

Таблица 1

Хроматографические характеристики метода анализа

Параметр	Значение	
	Эналаприл	Эналаприлат
Время удерживания, мин	8,4	9,7
Коэффициент емкости	3,7	4,4
Число теоретических тарелок	41383	21845
Степень извлечения, %	75	75

Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта с использованием программного обеспечения ChemStation фирмы «Agilent». Калибровочную кривую получали в результате анализа проб плазмы с добавками известных количеств эналаприлата, эналаприла и каптоприла. Зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций 0,5 – 200 нг/мл. Для эналаприлата график

описывался линейным уравнением $Y = mx + b$, где $m = 30,60$, $b = -0,0023$, коэффициент корреляции $0,99931$, предел обнаружения $0,1$ нг/мл в плазме. Для эналаприла график описывался линейным уравнением $Y = mx + b$, где $m = 58,15$, $b = -0,0058$, коэффициент корреляции $0,99918$, предел обнаружения $0,1$ нг/мл.

На рис. 1 представлены хроматограммы контрольной плазмы (А), контрольной плазмы с добавлением внутреннего стандарта (Б), плазмы содержащей 50 нг/мл эналаприла и эналаприлата (С), плазмы крови пациента через 2 часа после перорального приема препарата «Эналаприл» производства ЗАО «Северная Звезда» (Д).

В табл. 2 приведены метрологические характеристики методики количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови по результатам 6 параллельных измерений концентрации в образцах плазмы с добавками известных количеств анализируемых веществ.

Таблица 2.

Метрологические характеристики методики определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	s, нг/мл	SR, нг/мл	e_R
Эналаприлат				
1	$1,01 \pm 0,046$	0,037	0,037	0,011
10	$10,13 \pm 0,31$	0,25	0,025	0,013
100	$100,04 \pm 2,90$	2,35	0,024	0,005
Эналаприл				
1	$1,01 \pm 0,036$	0,029	0,029	0,006
10	$10,06 \pm 0,12$	0,092	0,0092	0,005
100	$99,86 \pm 3,2$	2,6	0,026	0,014

На рис. 2,3 представлены средние значения концентраций эналаприла и эналаприлата во времени (в линейных координатах) после однократного введения препаратов. Как видно из сравниваемых кривых характер зависимости “концентрация – время” практически не отличается. Максимальная концентрация препарата составляла для эналаприла - $71,49 \pm 23,79$ и $45,41 \pm 16,02$ нг/мл и для ренитека - $75,66 \pm 24,46$ и $45,11 \pm 16,91$ нг/мл, время достижения максимальной концентрации составляло $0,83 \pm 0,3$ и $2,39 \pm 0,5$ ч и $0,78 \pm 0,31$ и $2,31 \pm 0,55$ часа для основного вещества и метаболита соответственно.

Таблица 3

Усредненные фармакокинетические параметры эналаприла и эналаприлата после однократного приема препаратов в дозе 10 мг

	C_{max} , нг/мл	T_{max} , ч	AUC_{0-t} , нг/ч/мл	$T_{1/2}$, ч	C_{max}/AUC_{0-t} , ч ⁻¹
Эналаприл					
Эналаприлат	$45,41 \pm 16,02$	$2,39 \pm 0,5$	277,40	8,24	0,171
Эналаприл	$71,49 \pm 23,79$	$0,83 \pm 0,3$	156,02	4,37	0,479
Ренитек					
Эналаприлат	$45,11 \pm 16,91$	$2,31 \pm 0,55$	268,23	8,41	0,181
Эналаприл	$75,66 \pm 24,46$	$0,78 \pm 0,31$	162,15	4,57	0,486

Результаты расчетов фармакокинетических параметров препаратов Эналаприл и Ренитек представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что значения всех рассчитанных параметров

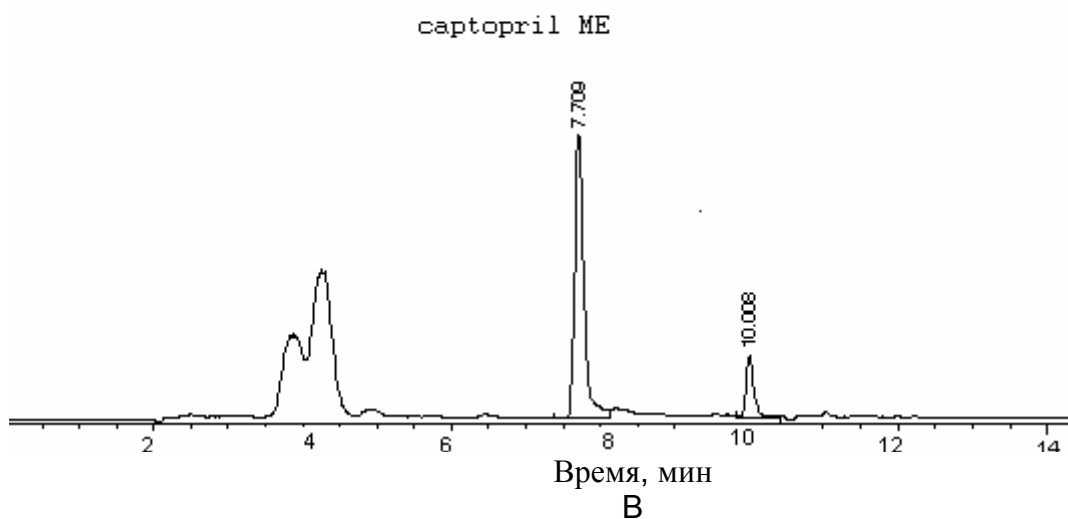
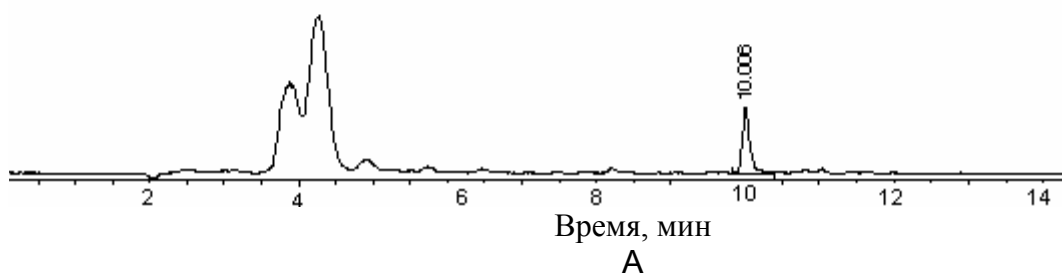
фармакокинетики статистически достоверно не отличаются. Так, площадь под фармакокинетической кривой (от нуля до последнего забора крови) для препарата Эналаприл составляла для основного вещества и метаболита – $156,02 \pm 59,84$ и $277,4 \pm 82,42$ нг ч/мл, а для препарата Ренитек – $162,15 \pm 5,49$ и $268,23 \pm 81,67$ нг ч/мл. Остальные параметры фармакокинетики ($T_{1/2}$, C_{max}/AUC_{0-t}) также были близкими. Средние значения биодоступности (f) препарата Эналаприл по отношению к препарату Ренитек для эналаприла составляет $0,98 \pm 0,247$ и для эналаприлата – $1,051 \pm 0,186$ (доверительные интервалы $0,857 \div 1,103$ и $0,959 \div 1,143$ соответственно). Значение относительной степени всасывания (f') для изучаемых препаратов составляет $0,967 \pm 0,221$ эналаприл и $1,025 \pm 0,145$ эналаприлат (доверительный интервал $0,857 \div 1,076$ и $0,953 \div 1,097$).

Таким образом, не выявлено статистически достоверных различий в процессе всасывания (как по полноте, так и по скорости всасывания) препаратов Эналаприл и Ренитек.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. В. Жучкова, Е. А. Лицарева, Е. Л. Самойлова, Н. Л. Спивак (ред.), Справочник Видаль, АстраФармСервис, Москва (2003).
2. H. Tajerrzadeh, M. Hamidi, J. Pharm. Biomed. Anal., **4**, 75 - 80 (2001).
3. Lu Tian-Sheng, Li Yang, J. Thomas, et al., J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., **8**, 298 – 303 (2001).
4. Kh. Matalka, T. Arafat, M. Hamad, et al., Fund. and Clin. Farm., **16**, 237 – 244 (2002).
5. A. Kocijan, R. Granek, D. Kocjan, et al., J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., **784**(2), 229 - 235 (2001).
6. В. Eistert, M. Regits, G. Heck, et al., Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, **10**, 552 - 553 (1968).
7. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов, МЗ РФ, Москва (2001).

Рис.1 Хроматограмма контрольного образца плазмы крови пациента (А), образца плазмы крови с содержанием каптоприла 2 мкг/мл (В), образца плазмы крови, содержащей по 50 нг/мл эналаприла и эналаприлата, каптоприла 2 мкг/мл (С) и хроматограмма плазмы крови пациента через 2 часа после перорального приема исследуемого препарата эналаприла в дозе 10 мг (содержание каптоприла 2 мкг/мл).



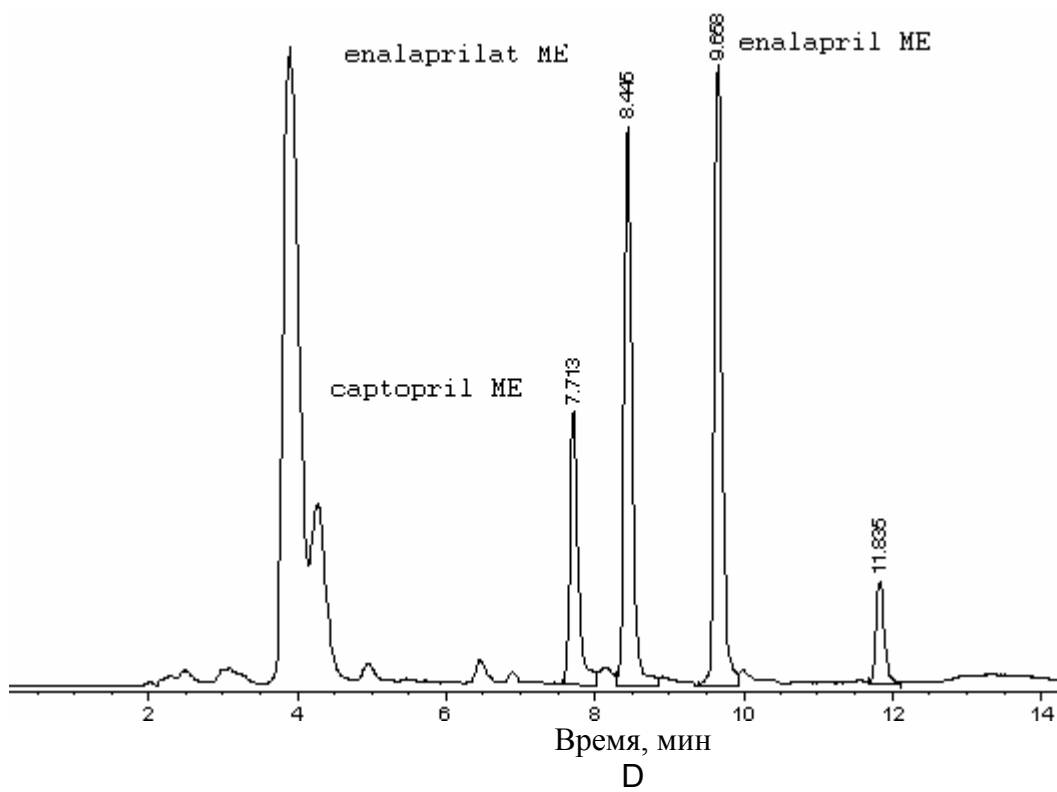
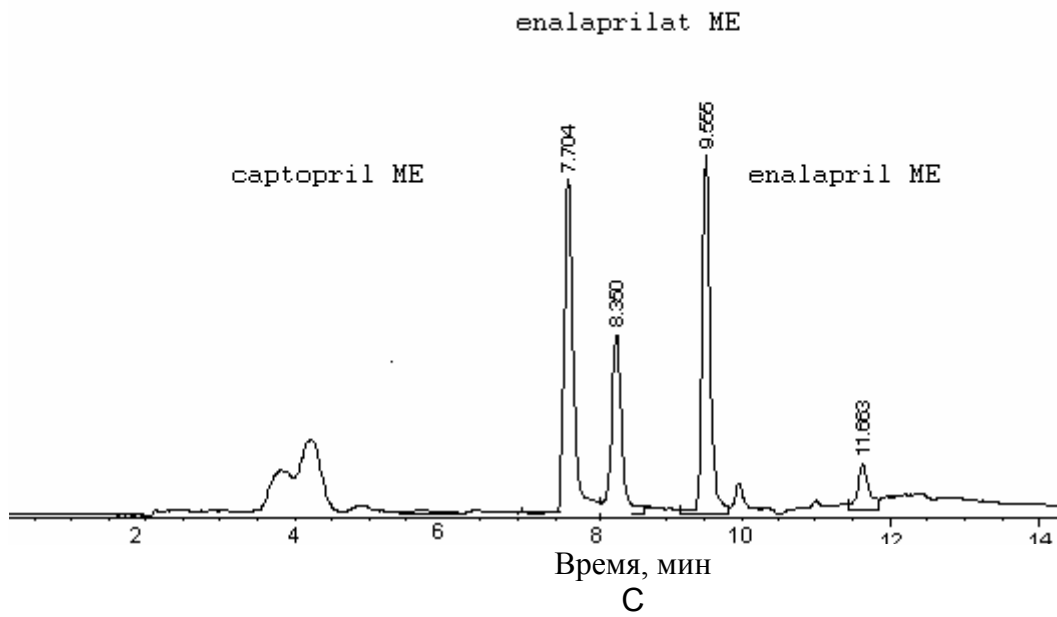


Рис.2 Средние фармакокинетические кривые эналаприлата.

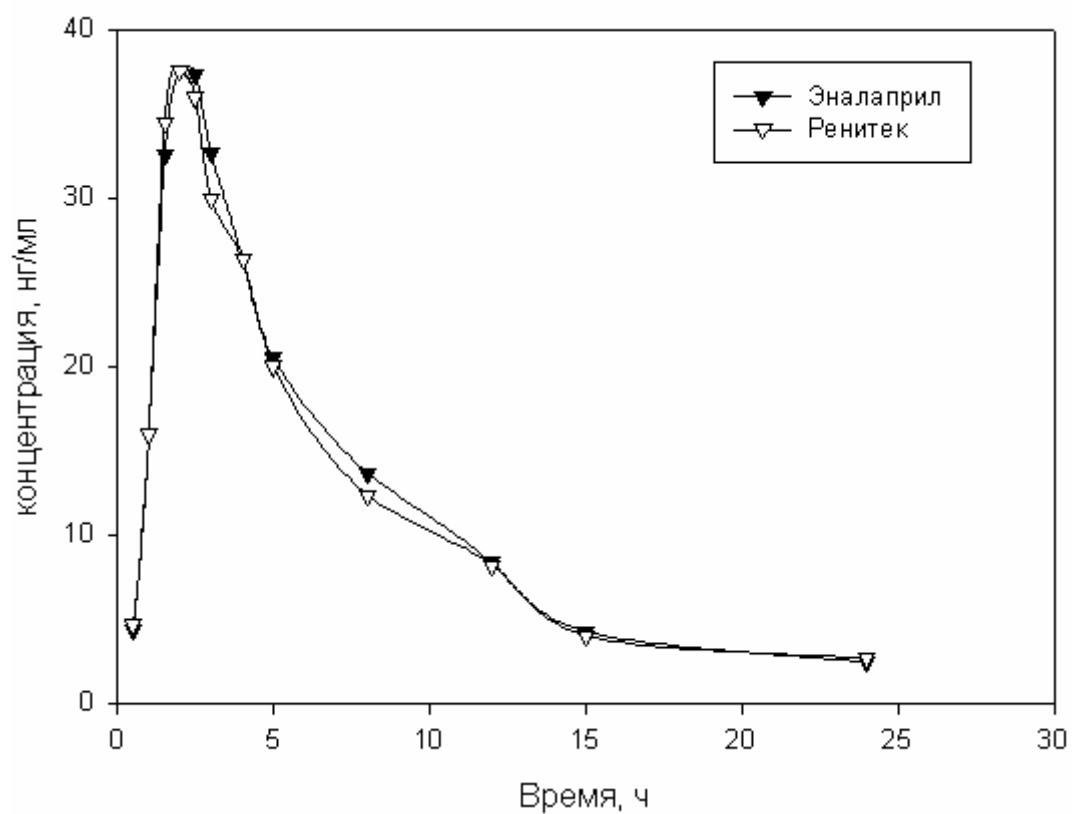


Рис. 3 Средние фармакокинетические кривые эналаприла.

